Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. F. Schleyer

Untersuchungen zur Mengenbestimmung von Blutflecken in Textilien mit der Präzipitinmethode und mittels Rest-N-Bestimmung

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Ingrid Weede

aus Schneidemühl

Marburg 1968

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. F. Schleyer

Untersuchungen zur Mengenbestimmung von Blutflecken in Textilien mit der Präzipitinmethode und mittels Rest-N-Bestimmung

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Ingrid Weede

aus Schneidemühl

Marburg 1968

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der
Universität Marburg am 9. Juli 1968

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. med. R. Siegert

Referent: Prof. Dr. med. F. Schleyer

Correferent: Doz. Dr. med. W. Schiff

Inhalt

Seite

A. Einleitung 5

B. Die Präzipitinmethode 6

I. Die Originalmethode nach SCHULZ 6

II. Eigene Versuche 8

1. Material 8

2. Vorversuche 8

3. Hauptversuche 10

4. Ergebnisse 11

5. Methode im Agargel 12

6. Ergebnisse 14

C. Die Reststickstoff-Bestimmung 16

I. Die Originalmethode nach MITA 16

II. Eigene Versuche 19

1. Material 19

2. Reststickstoff-Bestimmung am Vollblut . . . 20

3. Ergebnisse 24

D. Besprechung 28

I. Präzipitinmethode 28

II. Reststickstoff-Bestimmung 30

E. Zusammenfassung 32

F. Literatur 33

A. Einleitung

Im gerichtlich-medizinischen Laboratorium ist gelegentlich die Frage nach der Menge eines Blutextravasates zu beantworten. Solche Extravasate finden sich naturgemäß meistens in Wäsche, zuweilen aber auch auf undurchlässigen Unterlagen.

Die ersten experimentellen Untersuchungen zur Blutmengenbestimmung stammen aus dem Anfang des Jahrhunderts, und es sind für diesen Zweck sehr verschiedenartige Methoden angegeben worden (vollständige Zusammenstellung bei SCHLEYER). Die älteren dieser Verfahren sind eigentlich nie systematisch nachgearbeitet worden. Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die Präzipitinmethode von SCHULZ und die Methode der Rest-N-Bestimmung von MITA an Blutflecken in Textilien nachzuprüfen.

B. Die Präzipitinmethode

I. Originalmethode nach SCHULZ

SCHULZ hatte beobachtet, daß die speciesspezifischen Trübungen von präzipitierenden Seren mit Blut oder Seren nur bei Anwesenheit von Soda- oder Kochsalzlösung, entsprechend der Verdünnung des Blutes, bei immer gleichem Antiserumzusatz gleichmäßige Abstufungen zeigten. Außerdem stellte er fest, daß Blutverdünnungen gleicher Konzentration auch zu derselben Zeit präzipitiert wurden. Diese beiden Beobachtungen führten ihn zu folgender Überlegung:

Laugte er einen Blutflecken mit einer bekannten Menge Kochsalzlösung aus und verdünnte diesen Extrakt in den gleichen Stufen wie eine entsprechende Menge Vollblut, so mußte, unter Berücksichtigung der bekannten Menge Extraktionsflüssigkeit, die Präzipitation durch Antiserum bis zu der gleichen Verdünnungsstufe gehen. Als maximale Zeit der Ablesung setzte er 30 Minuten an.

Die Blutmenge konnte dann nach folgender Gleichung errechnet werden: die gesuchte Blutmenge sei X, die zur Extraktion benutzte, bekannte Menge Kochsalzlösung sei k. In dem Extrakt verhält sich die gesuchte Menge Blut zu der Menge Extrakt wie X:k. Verdünnt man den Extrakt mit nochmals der gleichen Menge Kochsalzlösung, so verhält sich die gesuchte Menge Blut zu dem Extrakt wie X:2 x k. Verdünnt man den Extrakt weiter geometrisch mit einer dem Extrakt ent-

sprechenden Menge Kochsalzlösung, so verhält sich die gesuchte Menge Blut zu dem Extrakt wie X:4 x k, sodann erhält man die Verdünnungsstufe X:8 x k, X:16 x k, X:32 x k usw. Ebenso muß das Vollblut geometrisch verdünnt werden. Bei den Verdünnungsreihen wird präzipitierendes Antiserum zugesetzt.

SCHULZ gibt ein Rechenbeispiel für seinen Versuch: "War die Konzentration (gemeint ist: die letzte Präzipitationsstufe) einer der angelegten Verdünnungen schließlich ermittelt - sagen wir, der mit X:200 k bezeichneten Verdünnung - so ließ sich daraus der Wert für X selbst berechnen. Betrug die Konzentration (gemeint ist: der Titer des Antiserums = letzte präzipitierende Stufe der Blutverdünnungsreihe) z.B. 1:10 000, so verhielt sich 1:10 000 = X:200 k. Es war X = 1/50 k, oder wenn, wie wir annehmen wollen, k = 2 500 ccm betragen hatte, X = 50."

SCHULZ erzielte mit dieser Methode "außerordentlich günstige" Resultate. Noch nach 8 Monaten wies er die gesamte Blutmenge in Leinen nach, bis zu 10 Tagen in Sand, Gartenerde und Sägespänen. Ein Beispiel sei hier angeführt:

Titer des präzipitierenden Serums 1:10 000 (30 Min.) 1 ccm Blut in Handtuch , Zusatz von 100 ccm Kochsalzlösung. Blut 237 Tage alt.

Trübung nach 30 Minuten bis zur Verdünnung X:100 x k. Da k 100 ccm betrug, ist X = 1 = 100 %.

II. Eigene Versuche

1. Material

Die Versuche wurden mit Schweineblut angesetzt, das mit Zitrat oder Oxalat ungerinnbar gemacht worden war. Als präzipitierendes Serum diente Antischweineserum der Behring-Werke mit einem angegebenen Titer von 1:5 000. Der Titer entsprach der Antigenverdünnung. Das lyophilisierte Serum mußte vor Gebrauch in 0,5 ml sterilem destilliertem Wasser gelöst werden. Als Verdünnungsflüssigkeit diente physiologische Kochsalzlösung.

Für die Verdünnungsreihe wurden 13 Reagensgläser und 2 ml-Vollpipetten benutzt, während die Präzipitationsreaktion in 12 etwa 2 cm langen Uhlenhuth-Röhrchen stattfand. Als Ständer für diese kleinen Röhrchen diente ein Plastillinstreifen, in den die Röhrchen hineingedrückt wurden.

2. Vorversuche

Bestimmung des wirklichen Antischwein-Serumtiters am Serum des Schweineblutes:

Zunächst wurde eine geometrische Verdünnungsreihe des Schweinevollblutes hergestellt. 13 Reagensgläser wurden mit je 2 ml 0.9% Kochsalzlösung gefüllt und durchnumeriert. Das Schweinevollblut wurde zentrifugiert und das Serum in das mit Nr.1 bezeichnete Glas pipettiert, so daß sich das Zen-

trifugat zu der physiologischen Kochsalzlösung wie 1:1 ver=hielt. Anschließend wurden beide Flüssigkeiten gut durch=mischt und 2 ml in das Reagensglas 2 pipettiert, daß nun die Verdünnung 1:2 vorlag. Nachdem wieder gut durchmischt worden war, wurden hiervon 2 ml in das dritte Glas gefüllt (Verdünnung 1:4). So wurde die geometrische Reihe bis zu einer Verdünnung von 1:4096 fortgesetzt.

Nun begann erst der eigentliche Versuch, d.h. die Präzi=pitationsreaktion, ausgeführt als Ringreaktion. Mit einer Kapillare wurden - bei dem Reagensglas mit der stärksten Verdünnung beginnend - wenige Tropfen entnommen und vorsich=tig in das Uhlenhuth-Röhrchen, das mit der dem Reagensglas entsprechenden Nummer vorher versehen war, geblasen. Genaue Mengenverhältnisse spielten dabei keine Rolle.

Waren so alle Uhlenhuth-Röhrchen gefüllt, so begann das Unterschichten mit dem präzipitierenden Serum. Bei dem Un=terschichten war darauf zu achten, daß keine Luftblasen zwischen Röhrcheninhalt und Antiserum blieben, da die Reak=tion nur bei direkter Berührung beider Flüssigkeiten eintre=ten kann. Dreißig Minuten, nachdem das letzte Uhlenhuth-Röhrchen mit präzipitierendem Serum beschickt worden war, wurden die Präzipitationsringe abgelesen. Bei dem 11. Röhr=chen, das einer Verdünnung von 1:1024 entsprach, war der letzte Präzipitationsring zu sehen. Der wirkliche Antise=rumtiter betrug also 1:1024.

3. Hauptversuche

a) Anlegen von Blutflecken und Extraktion

Schweineblut, das mit Oxalat oder Zitrat ungerinnbar gemacht worden war, wurde auf weiße Leinenlappen pipettiert und jeweils die Menge auf dem Leinenlappen vermerkt. Die Flecken trockneten bei Zimmertemperatur und blieben so einige Tage hängen. Vor der weiteren Untersuchung wurden dann die Flecken in kleinste Stoffstückchen zerschnitten, über Nacht in physiologischer Kochsalzlösung gelöst und mit einer Flachzange kräftig ausgedrückt. Bis auf einen leicht gelblichen Schimmer im Leinen konnte alles Blut eluiert werden.

b) Verdünnungsreihe und Präzipitation

Der gewonnene Blutextrakt wurde genauso behandelt wie das Serum im Vorversuch. Zunächst wurde die geometrische Verdünnungsreihe aufgestellt, dann die Präzipitation in den Uhlenhuth-Röhrchen angeschlossen.

c) Berechnungsbeispiel für einen dieser Versuche

Der wirkliche Titer betrug 1:1024, der letzte Präzipitationsring lag bei 1:64. Das Verhältnis Extraktionsflüssigkeit : Kochsalzlösung k in ml betrug 30. Der Blutfleck war aus 2 ml Blut angelegt und die gesuchte Menge Blut als X bezeichnet worden.

Dann war:

$$1 : 1024 = x : 64 \times 30$$

$$x = \frac{64 \times 30}{1024}$$

$$x = \frac{1920}{1024}$$

$$x = 1{,}87$$

4. Ergebnisse

Tabelle I (Antiserumtiter 1:1024)

Blutfleck in ml	Alter in Tagen	Kochsalz-lösung k in ml	Letzte Präzipitations-stufe	Gefundene Blutmenge x in ml	Defizit in %
2	1	30	1:64	1,87	7
3	1	40	1:64	2,50	17
5	5	110	1:32	3,43	31
10	10	100	1:64	6,25	38

5. Präzipitationsmethode in Agargel

Im Prinzip entspricht dieser Versuch dem vorigen, nur treffen hier beide Flüssigkeiten nicht direkt, wie bei der ersten Methode, aufeinander, sondern diffundieren in das Agargel, um dann miteinander zu reagieren.

a) Zubereitung des Gels

1% Special Agar-Noble Difco in Wasser wurde im siedenden Wasserbad etwa 30 Minuten erhitzt, bis ein wasserklares Sol entstand, anschließend wurden sofort insgesamt 3 ml der heißen Flüssigkeit auf je einen fettfreien Objektträger, der genau waagerecht liegen mußte, pipettiert. Die Flüssigkeit erstarrte in wenigen Minuten. Mit einer Stanze, die an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen war, wurden Sechserrosetten in das erkaltete Gel gestanzt. Auf einen Objektträger paßten zwei Rosetten. Die so für den Versuch vorbereiteten Objektträger (Abb.1) mußten in einer feuchten Kammer vor dem Austrocknen geschützt werden. Die einzelnen peripheren Löcher der Rosette wurden auf einem entsprechenden Papiervordruck durchnumeriert.

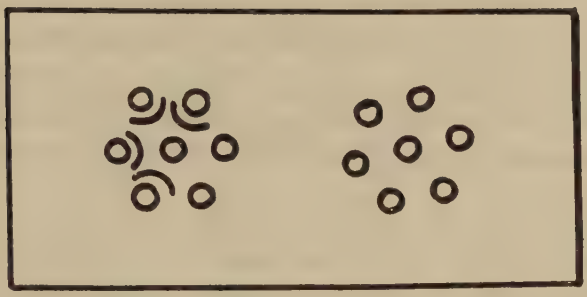

Abb. 1. Schema der Höhlungen im Agar. Links mit willkürlich eingezeichneten Präzipitationsbanden

b) Diffusionstechnik im Gel

Die einzelnen peripheren Höhlungen der Rosette wurden mittels Kapillare mit der Flüssigkeit der geometrischen Verdünnungsreihe gefüllt, entsprechend der Röhrchennummern. Es wurde wieder mit der stärksten Verdünnung begonnen. In die zentrale Höhlung wurde Antischweineserum gefüllt. Die Objektträger blieben über Nacht in der feuchten Kammer. Etwa 24 Stunden später konnten die Präzipitatbanden abgelesen werden (Technik nach SCHLEYER).

6. Ergebnisse

Tabelle II (Antiserumtiter 1:1024)

Blutfleck in ml	Alter in Tagen	Kochsalz= lösung k in ml	Letzte Prä= zipitations= stufe	Gefundene Blutmenge x in ml	Defizit in %
5	1	60	1:8	0,46	92
15	1	100	1:128	12,5	17
20	2	150	1:128	18,7	7
5	6	60	1:64	3,7	26
20	12	100	1:128	11,3	44
30	12	250	1:64	15,6	48
2	16	20	1:32	0,62	69

Tabelle III (Antiserumtiter 1:512)

Blutfleck in ml	Alter in Tagen	Kochsalz= lösung k in ml	Letzte Prä= zipitations= stufe	Gefundene Blutmenge x in ml	Defizit in %
1	1	100	1:4	0,78	22
2	1	200	1:4	1,60	20
10	2	100	1:32	6,20	38
20	2	150	1:64	18,7	7
5	3	300	1:8	4,7	6
40	4	300	1:64	37,4	7

Tabelle IV (Antiserumtiter 1:4096)

Blutfleck in ml	Alter in Tagen	Kochsalz= lösung k in ml	Letzte Prä= zipitations= stufe	Gefundene Blutmenge x in ml	Defizit in %
1	1	100	1:32	0,78	22
2	1	200	1:16	1,5	25
5	1	300	1:64	4,7	6

Bei den Versuchen der Tabelle III und IV wurde die Ex= traktion der Blutflecken abgeändert: die Blutflecken wurden, nachdem sie kleingeschnitten worden waren, in einer elektri= schen Kaffeemühle gemahlen. Das pulverisierte Material wurde in einer Fritte ausgelaugt. Die Fritte war zu diesem Zweck über eine Waschflasche mit einer Wasserstrahlpumpe verbunden. Weder in der Kaffeemühle noch in der Fritte durften Reste des Blutfleckmaterials haftenbleiben.

C. Reststickstoff-Bestimmung

I. Originalmethode nach MITA

MITA ging von der Überlegung aus, daß der Stickstoffgehalt vergossenen Blutes mit demjenigen des ursprünglichen Blutes übereinstimmen mußte. Daher bestimmte er in seinen Versuchen zunächst den Reststickstoffgehalt des Versuchsblutes, um dann erst den Stickstoffgehalt von Flecken des gleichen Blutes zu untersuchen. Dabei sollte Übereinstimmung der Werte erzielt werden.

Zur Ausführung des Versuches benutzte MITA die Reststickstoff-Bestimmung von KJEHLDAHL.Er verwandte Leichenblut von Menschen und Pferden.

15 ml Blut wurden mit Kochsalzlösung auf ein Volumen von 100 ml aufgefüllt. Die Menge Kochsalzlösung entsprach der späteren Auslaugungsflüssigkeit des Blutfleckens. Dann wurden 5 ml dieser Blutlösung zusammen mit 10 ml 10% Calciumsulfatlösung und 10 ml konzentrierter Schwefelsäure in einen Rundkolben pipettiert und solange erhitzt, bis die Flüssigkeit grünlich wurde. Nach Erkalten wurden 5 g Talcum venetum zugesetzt und mit 220 ml Wasser ausgefüllt. Als nächster Schritt folgte die Destillation. Ein als Absorptionsgefäß dienender Erlenmeyerkolben wurde mit 15 ml 1/5 n Schwefelsäure und 30 ml Natronlauge vom spezifischen Gewicht von 1,5 gefüllt. Nun wurde die vorher durchgeschüttelte Flüssigkeit erhitzt, bis 200 ml Destillat gebildet worden waren.

Zum Schluß folgte die Rücktitration mit n/10 Natronlauge und Kongorotlösung als Indikator.

Ebenso wurde der während 24 Stunden ausgelaugte zerkleinerte Blutfleck behandelt.

Die Blutmenge wurde dann nach folgender Gleichung bestimmt:

$$\frac{a}{100} = \frac{b}{x} \quad ;$$

a = bekannter Rest-N des Vollblutes,

b = gesuchter Rest-N des Extraktes.

MITA untersuchte vorwiegend Blutspuren in Kleidungsstükken und Erde. Dabei wies er in Leinen noch nach 12 Monaten, in Erde noch nach 6 1/2 Monaten die gesamte Blutmenge nach. Zwei Beispiele MITAs seien hier angeführt:

15 ccm Pferdeblut auf 1 Liter verdünnt, 5 ccm der Blutlösung zur Probe genommen.

Gesamtstickstoff in 15 ccm Blut 0,476 g. Blut 12 2/3 Monate alt. Gesamtmenge der Extraktionsflüssigkeit 1 Liter, 5 ccm derselben zur Probe genommen. Gesamtstickstoff in der Extraktionsflüssigkeit 0,476 g.

15 ccm Pferdeblut auf 1 Liter verdünnt, 5 ccm der Blutlösung zur Probe genommen. Gesamtstickstoff in 15 ccm Blut 0,420 g. Blut 6 1/2 Monate alt. Gesamtmenge der Extraktionsflüssigkeit 1 Liter, 5 ccm derselben zur Probe genommen. Gesamtstickstoff in der Extraktionsflüssigkeit 0,420 g.

KRAFT untersuchte die Methode MITAs an Blutspuren im Erdboden. Er gibt zu bedenken, daß die mengenmäßige Bestim-

mung des Blutes aus Spuren im Boden andere Resultate ergeben muß als aus Spuren an anderen Gegenständen, wie z.B. an Klei= dern und dgl. Bei den Versuchen nach MITA mußte er sich al= lerdings auf einige wenige beschränken - wie er in seiner Arbeit erwähnt -, da ihm nur eine begrenzte Zahl an Versu= chen ermöglicht wurde. Auch hier bestimmte er zunächst den Rest-N des reinen Blutes, um dann die Blutspuren mit Kochsalz= lösung auszulaugen und ebenso den Rest-N nach KJEHLDAHL zu bestimmen. Aus seinen Ergebnissen geht hervor, daß er in keinem Fall die gesamte Blutmenge nachweisen konnte. Es ist eine deutliche Abhängigkeit der Blutflecken vom Alter zu er= kennen. Ebenso spielte die Beschaffenheit des Bodens eine Rolle. Die Fehlerergebnisse reichen bei den Versuchen im fe= sten Boden nach drei Tagen bis 17%, im lockeren bis 29%. Die ältesten Blutflecken nach 4 Wochen zeigen in lockerem Boden ein Defizit bis 51% und bis 40% in festem Boden.

Hier sei ein Beispiel aus seinen Tabellen angeführt: 100 cm Blut im Erdboden wurden untersucht. Der Stickstoff= gehalt des Blutes (a) betrug in diesem Falle 46,8 mg-%, der der Auslaugungsflüssigkeit (b) betrug 33,6 mg-%.

Da a:100 = b:x, so ist 46,8:100 = 33,6:x. Demnach x = 33600:468 = 71,79 ccm.

II. Eigene Versuche

Die Herstellung der Blutflecken und die Extraktion entsprach genau dem Verfahren bei der Präzipitinmethode, wobei ebenfalls die Kaffeemühle zum Zerkleinern der Blutflecken und danach die Fritte zur Extraktion verwendet wurde. Als Extraktionsflüssigkeit diente 0,1% Natriumkarbonatlösung. Die Reststickstoff-Bestimmung wurde nach KJEHLDAHL vorgenommen. Die Technik entsprach im wesentlichen der bei BREHMER beschriebenen Methode von WÜST.

1. Material

a) Reagentien:

20% Trichloressigsäure
konz. Schwefelsäure
Selenreaktionsgemisch
Kjehldahllauge
n/100 Schwefelsäure
Kaliumjodidlösung 5%
Kaliumjodat
Stärkelösung
n/100 Natriumthiosulfat

b) Glasgeräte:

2 Pipetten 1,0 ml
1 Pipette 1,5 ml
2 Pipetten 2,0 ml
1 Pipette 2,5 ml
1 Kjehldahlkolben

1 Meßkolben 25 ml

1 Trichter

6 Diffusionsschalen

2. Reststickstoff-Bestimmung am Vollblut

a) Enteiweißen

1 ml ungerinnbares Schweineblut wurde mit 2 ml 20% Trichloressigsäure in ein Zentrifugenglas gefüllt und scharf zentrifugiert, bis eine klare Flüssigkeit entstand. 1,5 ml dieses Zentrifugats wurden so in einen Kjehldahlkolben überführt, daß keine Reste an seinem Hals haften blieben. Danach wurden, ohne daß die Pipettenspitze in die enteiweißte Flüssigkeit tauchte, 1 ml konzentrierte Schwefelsäure und drei bis vier Glasperlen als Siedesteinchen hinzugegeben. Als Katalysator diente eine Messerspitze Selenreaktionsgemisch.

b) Veraschen und Überspülen

Der zur Veraschung beschickte Kjehldahlkolben mußte zunächst vorsichtig unter dem Abzug erhitzt werden, damit die Feuchtigkeit verdampft. Nach etwa 10 Minuten wurde die Flamme so eingestellt, daß ein gleichmäßiges Sieden erreicht wurde. Anfangs verfärbte sich die Veraschungsflüssigkeit leicht bräunlich. Es traten dann weißliche, dichte Nebeldämpfe auf. Mit ihrem Verschwinden war die Flüssigkeit hellgrün geworden und damit der Veraschungsprozeß abgeschlossen.

Hatte sich der Kolben im Abzug abgekühlt, so wurde die grünliche Flüssigkeit in einen 25 ml Kolben überspült, indem wiederholt der Kjehldahlkolben mit kleinen Portionen destilliertem Wasser ausgewaschen und diese Flüssigkeit durch einen Trichter in den 25 ml Kolben gefüllt wurde. Dann wurde das Kölbchen gut durchgeschüttelt.

c) Füllung der Zellen

In die innere Zelle wurden 2 ml n/100 Schwefelsäure vorgelegt. Danach wurden in die äußere Zelle 2,5 ml Veraschungsflüssigkeit pipettiert und mit 2 ml N-freier Kjehldahllauge versetzt. Die Diffusionsschalen wurden anschließend sofort durch die eingefetteten Glasstopfen verschlossen. Die beiden Flüssigkeiten in der äußeren Zelle wurden durch drehende Bewegungen des Gefäßes gut durchmischt, dabei mußte sorgfältig das Einfließen der Lauge in die mittlere Zelle, sowie das Benetzen der Schlifffläche während des Pipettierens vermieden werden, da andernfalls eine Stickstoffbestimmung durch Neutralisation der vorgelegten Säure unmöglich wäre, oder aber der Schliff verklemmte sich nach Antrocknen der Lauge.

Anschließend kamen die Schalen über Nacht in den Wärmeschrank bei 55°.

d) Titration und Rechnung

Die Rücktitration war wegen der Schärfe des Umschlagpunktes jodometrisch vorzunehmen. Sie fand direkt in der mittleren Zelle statt. Es wurde ein Titrationsgerät (Her-

steller: STRÖHLEIN) benutzt. Die Mikrobürette mußte mit ihrem kapillarem Auslauf bis auf 1 cm über der mittleren Kammer in die Diffusionsschale hineinreichen, damit während des Titrierens keine Substanz verspritzt werden konnte. Gleichzeitig mußte unter kleinen Drehbewegungen die Titrationsflüssigkeit bewegt werden, damit der Umschlagspunkt auf einen halben Tropfen genau bestimmt werden konnte.

Es wurden wenige Tropfen Kaliumjodid und ein bis zwei Körnchen Kaliumjodat in die mittlere Zelle gegeben, um eine hellbraune Farbe zu erhalten. Unter ständiger Rotation der Flüssigkeit wurde bis zur Gelbfärbung titriert. Dann wurde die Lösung mit zwei Tropfen Stärkelösung versetzt und die Titration bis zum Umschlag in Farblos tropfenweise fortgesetzt. Den Hauptversuchen liefen drei Blindversuche parallel.

Vor jeder Titration mußte der Faktor der Thiosulfatlösung bestimmt werden, da eine Äquivalenz der vorgelegten Säure und der Titrationsflüssigkeit herrschen mußte. 2 ml n/100 Schwefelsäure wurden in der beschriebenen Weise titriert, um den Verbrauch an Thiosulfatlösung festzustellen. Bei Äquivalenz hätten genau 2 ml n/100 Thiosulfatlösung verbraucht werden müssen.

Daraus folgte: Der Verbrauch an Natriumthiosulfat war durch die Menge der vorgelegten Säure (2 ml Schwefelsäure) zu dividieren. Dadurch war der Faktor ermittelt, der die Abweichung der Äquivalenz von der vorgelegten Säure und der Titrationsflüssigkeit berichtigte.

Der Reststickstoff konnte dann mit Hilfe folgender Formel errechnet werden:

$$(b-a \times f) \times 0{,}14 \times 2000 = \text{mg-\% N};$$

Dabei ist: a = verbrauchte Menge $Na_2S_2O_3$,

b = vorgelegte Menge H_2SO_4 ,

f = Atomgewicht des Stickstoffs ,

2000 = Verdünnungsfaktor.

Der eben beschriebene Versuch wurde für die Bestimmung des Reststickstoffgehalts des Schweinevollblutes, sowie für die Bestimmung der Extraktionsflüssigkeit benutzt. Zur Umrechnung auf die gesuchte Blutflüssigkeitsmenge wurden die Werte in folgende Gleichung eingesetzt:

$$\frac{a}{100} = \frac{b}{x}$$

$$x = \frac{100 \times b}{a}$$

a = Rest-N des Vollblutes,

b = Rest-N des Extraktes

3. Ergebnisse

Tabelle I. Vorversuch 1

Versuchs-Nr.	Rest-N des Schweine=vollblutes in mg-%	Streuung in % vom Mittelwert 39,5
1	47,6	21
2	33,6	15
3	36,4	8
4	33,6	15
5	39,2	1
6	50,4	21
7	39,0	1
8	36,4	8

Tabelle II. Vorversuch 2

Versuchs-Nr.	Rest-N des Schweine=vollblutes in mg-%	Streuung in % vom Mittelwert 26,6
1	19,6	27
2	30,8	16
3	28,0	5
4	25,2	5
5	28,0	5
6	28,0	5
7	25,2	5
8	28,0	5

Tabelle III. Ergebnisse an Blutfleckenauszügen

Blutfleck in ml	Alter in Tagen	0,1% $NaCO_3$ als Ex= traktion in ml	Rest-N des Ex= traktes in mg-%	Gefundene Blutmenge x in ml	Defizit in %
0,5	3	100	19,6	0,37	26
0,5	10	"	16,8	0,32	34
1	14	"	28,0	0,53	47
1	19	"	25,2	0,95	5
1	1	"	-	-	-
1	2	"	-	-	-
1	3	"	-	-	-
1	4	"	-	-	-
2	4	200	-	-	-
1	5	"	-	-	-

Ein Rechenbeispiel für die Ergebnisse in Tabelle III:

Rest-N des Vollblutes (a) = 26,6

Rest-N des Extraktes (b) = 19,6

Da a:100 = b:x, x = 100 x b : a, ist also

26,6:100 = 19,6:x, x = 73,6

Der angelegte Blutfleck war 0,5 ml groß. Also ist: 0,5:100 = x:73,6, x = 0,37. Es liegt ein Defizit von 26% vor.

Daß die ersten 4 Ergebnisse der Tabelle III scheinbar positiv ausfielen, muß auf mangelnde Technik bei den ersten Versuchen zurückgeführt werden. Wie die folgenden Werte näm= lich zeigen, war eine Rest-N-Bestimmung gar nicht möglich. Die Ergebnisse der Titration entsprachen den Blindwerten. Dies wird verständlich, weil die Blutflecken bei der Extrak=

tion auf das Hundertfache, ja sogar auf das Zweihundertfache verdünnt wurden. Der Rest-N sinkt also von normalerweise 25-50 mg-% auf Werte von 0,25-0,50 mg-% ab. Diese Werte sind bei der Titration von 2 ml vorgelegter Schwefelsäure nicht mehr titrierbar.

Diese Tatsache führte zu folgendem Schluß: Die Extraktionsflüssigkeit mußte erst wieder eingetrocknet werden, um dann auf ein Minimum verdünnt zu werden. Der Extrakt wurde in flache Schalen gefüllt und verdunstete über Nacht völlig. Mit 2 oder 3 ml $NaCO_3$ wurde dann die Trockensubstanz gelöst. Die Extraktionsflüssigkeit kann vernachlässigt werden, stattdessen spielt die Auflösungsflüssigkeit der Trockensubstanz eine Rolle.

Tabelle IV. Versuche an eingeengten Fleckenauszügen

Blutfleck in ml	Alter in Tagen	Auffüllflüssigkeit in ml	Rest-N des Extraktes in mg-%	Gefundene Blutmenge x in ml	Defizit in %
1	6	4	44,8	0,42	58
1	9	4	42	0,39	61
2	12	10	30,8	0,1	99
2	10	10	-	-	-
5	14	10	-	-	-

Die Werte aus Tabelle IV müssen jedoch ebenfalls verworfen werden, da die Trockensubstanz, die auf ein kleines Volumen aufgefüllt worden war, nicht homogen wurde. Sie löste sich nur teilweise auf. Um die festen Bestandteile gänzlich zu lösen, wurde die Flüssigkeit in einer Schüttelmaschine

erst Minuten, dann aber, da dies nichts half, über Stunden geschüttelt. Auch so veränderte sich das Substrat nicht. Die Rest-N-Bestimmung blieb unausführbar. Weder am verdünnten Extrakt noch nach Kondensierung war es möglich, den Rest-N-Gehalt von Blutflecken zu bestimmen.

D. Besprechung

I. Präzipitinmethode

Für diese Methode sprachen die "äußerst günstigen" Resultate, die SCHULZ erzielte. SCHLEYER weist jedoch bereits auf Fehlerquellen dieser Methode hin. Einmal können körpereigene Proteine dem Untersuchungsgut beigemengt sein, andererseits kann Proteinverlust durch Fäulnis, Erhitzen oder Chemikalien eintreten (das erwähnt zum Teil schon SCHULZ selbst).

Geht man von der geometrischen Verdünnungsreihe aus, die in Form einer bestimmten Verdünnungsstufe in die Rechnung eingeht, so wird man einsehen, daß auch hier Fehlerquellen liegen. Die einzelnen Verdünnungsstufen weisen so große Intervalle auf, daß schon deshalb eine genaue Bestimmung kaum möglich ist. Nehmen wir z.B. die Verdünnungsstufe 1:2048 und die folgende 1:4096 an, so liegen zwischen beiden 2048 Möglichkeiten, die außer Acht gelassen werden mußten. Von der Rechnung her kann also bereits eine große Fehlerbreite vorliegen.

Betrachtet man nun die Technik des Uhlenhuth-Versuchs, so ist zu sagen, daß der Versuch unkompliziert erscheint und doch seine Schwierigkeiten aufweist. Vor allem sind die Fällungsringe mit steigender Verdünnung schwer zu erkennen. Auch wenn man das Röhrchen gegen einen dunklen Hintergrund hält, kann man sich leicht täuschen. Verschiedene Personen, die bei den hier beschriebenen Versuchen hinzugezogen wurden,

glaubten die letzten Präzipitatstufen bei den unterschiedlichsten Verdünnungsstufen zu sehen. Täuscht man sich auch nur um eine Verdünnungsstufe, so tritt ein Fehler von über 50% auf. Ist erst das Antiserum als Ausgangsmaterial getrübt, so ist eine Bestimmung überhaupt nicht mehr möglich. Die Gefahr der Trübung ist groß, auch wenn äußerst sauber gearbeitet wird und das Antiserum nach Gebrauch sofort verschlossen und im Kühlschrank verwahrt wird. Alle diese Punkte, nicht zuletzt die Ergebnisse, sprechen gegen diese Methode.

Die Diffusionstechnik ist nur insofern eine Verbesserung, als hier der Antiserum-Verbrauch wesentlich geringer ist und auch trübe Medien in den Versuch eingebracht werden können. Bei der Uhlenhuth-Methode muß in jedes der zwölf Röhrchen Antiserum gefüllt werden, während bei der Gel-Diffusionstechnik - bei gleich langer geometrischer Reihe - nur zwei Höhlungen im Agargel gefüllt zu werden brauchen. Sie entsprechen nur zwei Uhlenhuth-Röhrchen. Das Ablesen der Präzipitatbanden bereitet hier weniger Schwierigkeiten. Zu beachten ist allerdings, daß das Agargel nicht zu lange in der feuchten Kammer liegen darf, da sonst - war sie nicht luftdicht abgeschlossen - das glasklare Gel durch Pilze und Bakterien der Atmosphäre getrübt wird.

Bei der Präzipitinmethode im Uhlenhuth-Röhrchen zeigen die Ergebnisse, wie aus Tabelle I hervorgeht, ein mit dem Alter der Blutflecken steigendes Defizit. Bei einem 1 Tag alten Fleck liegt ein Defizit von nur 7% vor, während bei 10 Tage alten Flecken das Defizit auf 38% steigt. Die Defizite liegen damit noch unter 50%. Bei der Methode im Agargel ist diese deutliche Abhängigkeit vom Alter nicht so auffällig.

Hier treten jedoch Defizite von über 50% auf. Bei einem 2 ml großen Fleck, der ein Alter von 16 Tagen hatte, ist ein Defizit von 69% vorhanden. Diese schlechteren Ergebnisse, die trotz verfeinerter Methode entstanden, lassen sich nur auf die bereits erwähnten Schwierigkeiten dieser Methode zurückführen. Bei 1 - 2 Tage alten Flecken lag das Defizit bei der Methode im Agargel im Mittel bei 18,2%. Damit wäre diese Methode nur mit Einschränkung für frische Blutflecken verwendbar.

II. Reststickstoff-Bestimmung

Auch hier waren die vom Autor beschriebenen Untersuchungsergebnisse "äußerst günstig". SCHLEYER gibt zu bedenken, daß der konkrete Rest-N-Gehalt des Blutes selten zu ermitteln sein dürfte. Der normale Rest-N-Gehalt des Blutes liegt zwischen 25-50 mg-%, kann aber unter pathologischen Bedingungen auf Werte von 200 mg-% und mehr steigen. Sieht man von dieser Möglichkeit ab, so kann doch Stickstoff aus anderer Quelle dem Rest-N-Gehalt des Blutes beigemengt sein und den wahren Rest-N beeinflussen. Das Leinen der Blutflecken kann bereits stickstoffhaltig sein. Dann kann sich vermehrter Stickstoffgehalt der Luft auf den Blutflecken niederschlagen. Bei dem Kjehldahl-Verfahren kann Stickstoff an den Glasgeräten haften. Schon geringe Mengen stören die sehr genaue Rest-N-Bestimmung nach KJEHLDAHL. Wie sehr diese Verunreinigungen des Stickstoffes eine Rolle spielen, kann man sich vorstellen, wenn es sich um so geringe Mengen Stickstoff handelt, wie sie in den Blutverdünnungen des Extraktes vorliegen.

Neben den genannten Fehlerquellen zeigte sich, daß die Rest-N-Bestimmung wegen der großen Verdünnung der Flecken-extrakte nicht möglich war. Selbst Kondensierung des Extraktes ließ keine besseren Ergebnisse zu. Bei KRAFT zeigte sich, daß selbst bei großen Mengen versickerten Blutes in Gartenerde (100 ccm) bereits nach einem Alter von 3 Tagen ein Defizit von 17% bei der Berechnung auftrat. Die Fehlerergebnisse bei seinen Versuchen nahmen entsprechend dem Alter des versickerten Blutes und der Beschaffenheit des Bodens zu, so daß in lockerem Boden schon nach 3 Tagen mit einem Fehlerdefizit von 29% zu rechnen sein mußte.

Für den Blutnachweis in Leinen erwies sich die Methode MITAs als unzureichend. Auch die von MITA veröffentlichten Werte und Ergebnisse ergeben einen Fehler vom Faktor 100. Das zeigt das Beispiel, das bereits auf Seite 17 angeführt wurde. MITA hatte in 15 ccm Pferdeblut, das auf 100 ccm aufgefüllt bzw. extrahiert wurde, 0,42 g Rest-N gefunden, d.h. also: wenn in 15 ccm Blut 0,42 g Rest-N enthalten sind, so mußten in 100 ccm Blut 2,666 g Rest-N enthalten gewesen sein bzw. 2666 mg pro 100 ml. Der normale Rest-N liegt aber, wie bereits erwähnt, zwischen 25-50 mg-%. Es läßt sich heute nicht mehr klären, wie die veröffentlichten Ergebnisse MITAs zustandegekommen sind.

Herrn Professor Dr. med. F. Schleyer danke ich für die Arbeitsmöglichkeit am Institut für Gerichtliche Medizin der Universität Marburg und für die Überlassung des Themas, seine Beratung bei den Versuchen und bei der Abfassung der Dissertation.

Lebenslauf

Am 28. April 1941 wurde ich als drittes Kind des damaligen Studienrates Dr. Walter Weede und seiner Ehefrau Annemarie geb. Becker in Schneidemühl geboren.

Im Januar 1945 kamen wir als Flüchtlinge nach Marburg an der Lahn, von wo wir nach Allna evakuiert wurden. Dort wurde ich 1947 eingeschult. Von 1952 bis 1962 besuchte ich das Real= gymnasium für Mädchen in Marburg und bestand dort am 28.2. 1962 die Reifeprüfung.

Zum Sommersemester 1962 immatrikulierte ich mich als Student der Medizin an der Philipps-Universität. Am 24.4.1963 bestand ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung und am 30.10.1964 die ärztliche Vorprüfung. Während der klinischen Semester blieb ich in Marburg und erhielt im Wintersemester 1966 das Thema meiner Dissertation.

Am 18.12.1967 bestand ich an der Philipps-Universität Marburg die ärztliche Prüfung.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

Ammon, Bechtelsheimer,Beckmann, Berendes, Bickel, Bommer, Braun-Falco, Brück, Buchholz, Bücher, Dimroth, Dittrich, Dölle, Drawert, Exner, Gedigk, Golenhofen, Hamm, Hensel, Herrmann, Hess, Heuser, Hildebrandt, Hohorst, Jacob, Knauff, Korb, Lang,j., Lang,N., Linneweh, Löhr, Mahr, Mann, Martini, Marx, Mattes, du Mesnil de Rochemont, Müller,H.A., Neubauer, Niessing, Nocke, Peters, Petry, Petzold, Pots, Rodeck, Rohen, Sauer, Schiff, Schleyer, Schlosser, Schmid, Schmidt, Schwaiger, Seidel, Siegert, Siess, Spiegelberg, Staib, Straub, Streicher, Walcher, Wendt, Würterle.